

**ИССЛЕДОВАНИЕ АМИЛОИДОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОРИНОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*****Рыбинская Т.В., Портнягина О.Ю., Зелепуга Е.А., Хоменко В.А., Ким Н.Ю., Чингизова Е.А., Менчинская Е.С., Глазунов В.П., Чистюлин Д.К., Новикова О.Д.**

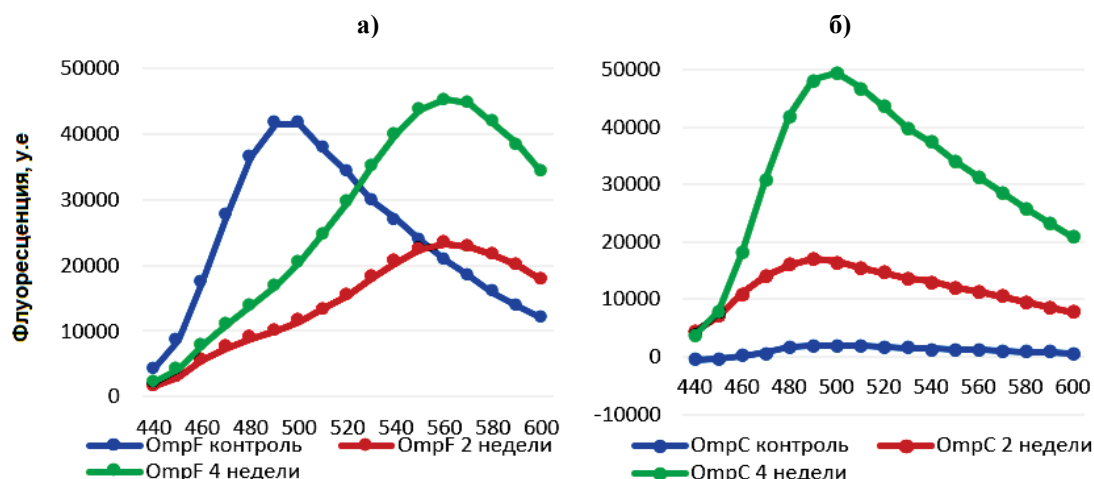
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН  
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 69002, РФ, e-mail: [tati2099.k@gmail.com](mailto:tati2099.k@gmail.com)  
Поступила в редакцию 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0514

**Аннотация.** В работе рассматривается процесс образования и свойства амилоидоподобных агрегатов неспецифических поринов (OmpC и OmpF) наружной мембраны грамотрицательной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* в кислой среде (рН 4,5) при повышенной температуре. Динамику формирования амилоидоподобных агрегатов поринов контролировали через две и четыре недели инкубации (при 42 °С) и через 3-5 ч (при 90 °С) с помощью окраски образцов амилоид-специфическим красителем тиофлавином Т, анализа спектров кругового дихроизма в дальней УФ-области, ИК-спектроскопии и конфокальной микроскопии. Обнаружено, что в случае OmpC порина инкубация в мягких условиях (42 °С) приводит к обратимому накоплению  $\alpha$ -спиральных участков в полипептидной цепи белка. В пространственной структуре OmpF порина в этих условиях существенных изменений не наблюдается, однако в жестких условиях (95 °С) происходит формирование амилоидоподобных агрегатов, которые отличаются повышенным содержанием структуры  $\beta$ -листа. С помощью ИК-спектроскопии показано, что конформационная перестройка в молекуле OmpF порина связана с изменением количества и качества элементов  $\beta$ -структуры. По данным конфокальной микроскопии агрегаты исследованных неспецифических поринов можно рассматривать как промежуточные продукты амилоидогенного пути – олигомеры. Согласно литературным данным эти олигомеры, предшествующие образованию зрелых фибрилл, обладают мембранолитическими и цитотоксическими свойствами. Для прогретых образцов исследованных поринов при реконструкции в бислоиные липидные мембраны не было обнаружено ни порообразующей, ни мембранолитической активности. По отношению к клеткам нейробластомы мыши Neuro-2a CCL-131<sup>TM</sup> полученные после инкубации агрегаты OmpF и OmpC поринов обладали более высокой токсичностью по сравнению с исходными образцами белков.

**Ключевые слова:** порины грамотрицательных бактерий, олигомеры, амилоидные фибриллы, взаимодействие с тиофлавином Т, цитотоксическая активность.

В настоящее время известно, что в природе широко распространены так называемые внутренне неупорядоченные белки (Intrinsically disordered proteins, IDPs) и белки с внутренне неупорядоченными белковыми регионами (Intrinsically disordered protein regions, IDPRs), которые выполняют в живой клетке самые разнообразные функции [1]. При определенных условиях IDP/IDPRs способны образовывать амилоидоподобные структуры. Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты с упорядоченной пространственной структурой, называемой «кросс- $\beta$ ». В природе IDPs/IDPRs широко распространены и осуществляют ряд основополагающих функций, в том числе в живой клетке. Например, внутренняя неупорядоченность является общей чертой многих белков, биологическое действие которых связано с передачей сигналов, регулированием и распознаванием. Репертуар амилоидов включает не только десятки патологических амилоидов млекопитающих, ассоциированных с целым рядом заболеваний, но и многочисленные микробные амилоиды. Различные виды патогенных бактерий используют белки в амилоидной форме для взаимодействия с эукариотическими организмами. До 2014 года в литературе встречались данные о механизмах и кинетике формирования амилоидов из водорастворимых глобулярных белков. В последние годы активно проводятся исследования пространственной организации и свойств амилоидов, сформированных из мембранных белков. В настоящей работе были исследованы динамика образования и некоторые биологические свойства амилоидоподобных агрегатов поринов OmpC (YpOmpC) и OmpF (YpOmpF) наружной мембраны грамотрицательной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis*.

Ранее в результате многолетних исследований структурных превращений поринов псевдотуберкулезного микроба под действием денатурирующих факторов, а также изучения их функциональных и биологических свойств был сделан однозначный вывод о том, что они обладают всеми характерными свойствами белков, содержащих в своей последовательности IDPRs, т.е. обладают *конформационной пластичностью* и *мультифункциональностью*. С помощью биоинформатических web ресурсов, таких как D<sup>2</sup>P<sup>2</sup> (<http://d2p2.pro/>) [2] и ODINPred (<https://stprotein.chem.au.dk/odinpred>) [3] был проведен анализ первичной структуры YpOmpF и YpOmpC поринов. Проанализировано количественное содержание амилоидогенных участков в аминокислотной последовательности рассматриваемых белков и с помощью их теоретических моделей определена локализация IDPRs [4]. Обнаружено, что значительное количество IDPRs находится в области наружных петель обоих поринов, напротив,  $\beta$ -тяжи, образующие  $\beta$ -баррель, таких участков не содержат, но существенно различаются по степени своей конформационной гибкости. Результаты исследования позволили классифицировать OmpF и OmpC порины псевдотуберкулезного микроба, как умеренно неупорядоченные белки.



**Рисунок 1.** Взаимодействие неспецифических поринов *Y. pseudotuberculosis* с флуоресцентным зондом тиофлавином Т. Спектры флуоресценции тиофлавина Т при связывании: с контрольными образцами белков и с белками, прогетыми в течение 2-х и 4-х недель при 42 °С в фосфатно-цитратном буфере (рН 4,5): YpOmpF (а) и YpOmpC (б)

В результате анализа литературных данных были выбраны условия, при которых амилоидоподобные структуры белков формируются с наибольшей вероятностью [5,6]. Мы инкубировали образцы YpOmpF и YpOmpC поринов в течение 14-28 дней при 42 °С и рН 4,5 и 5 ч при 95 °С рН 4,5.

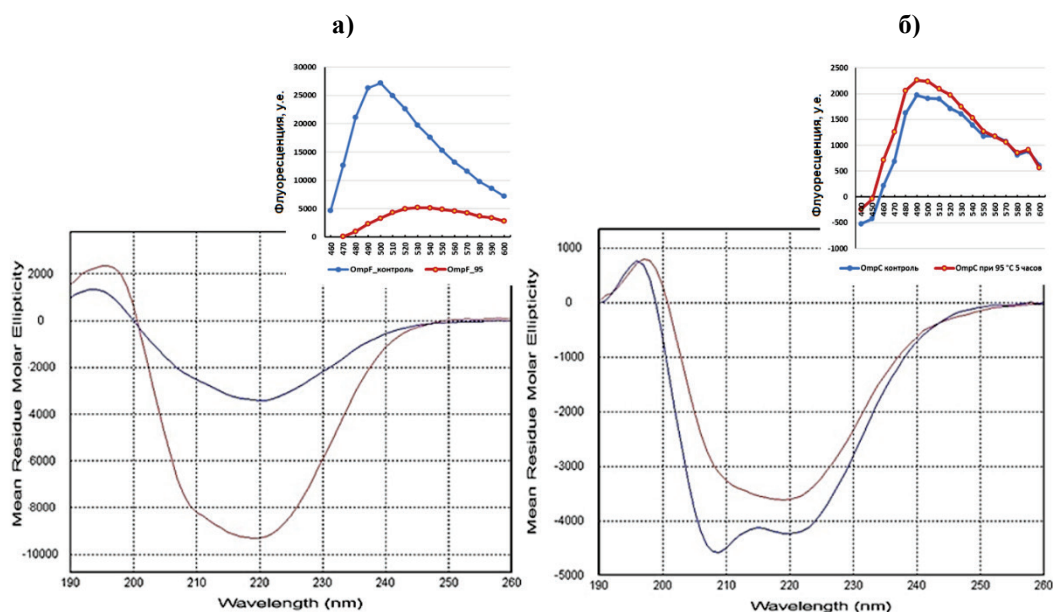
Наиболее распространенным методом определения присутствия амилоидных фибрилл в образце белка является взаимодействие их со специфическим красителем, тиофлавином Т (ThT). Встраивание красителя в фибриллы сопровождается длинноволновым сдвигом спектра поглощения и возрастанием коэффициента молярной экстинкции. Однако существует вероятность получения ложноположительного результата, обусловленного связыванием красителя с аморфными агрегатами или бактериями [7]. Порины, взятые для эксперимента, находились в растворе 0,25% ДСН, поэтому перед проведением реакции с ThT прогеты образцы белков были переведены в буфер без детергента с помощью центрифужных концентраторов Amicon Ultra-4, 30 кДа (Merck Millipore, США). Удаление детергента было необходимо, поскольку экспериментальным путем было установлено, что присутствие ДСН даже в очень низких концентрациях (0,0075%), существенно сдвигало положение максимума флуоресценции свободного ThT в длинноволновую область.

Как видно из данных, приведенных на рисунке, через 14 дней инкубации при 42 °С в случае YpOmpF наряду со сдвигом максимума флуоресценции в длинноволновую область происходило снижение интенсивности флуоресценции комплекса порин/краситель. Через 28 дней сдвиг максимума флуоресценции до 560 нм сохранялся, кроме того наблюдалось увеличение, почти в 2 раза, интенсивности флуоресценции.

В случае YpOmpC через 14 дней интенсивность флуоресценции комплекса красителя с порином увеличивалась более чем в 8,6 раза, однако без сдвига положения максимума флуоресценции. Через 28 дней наблюдалась дальнейшее увеличение интенсивности флуоресценции с незначительным длинноволновым сдвигом положения максимума спектра флуоресценции (рис. 1).

**Таблица 1.** Содержание элементов регулярной вторичной структуры OmpC и OmpF поринов *Y. pseudotuberculosis* в фосфатно-цитратном буферном растворе (рН 4,5) после инкубации в течение 2-х и 4-х недель при 42 °С

№ п/п	Образец	$\alpha$ -спираль	$\beta$ -структура
1.	OmpF контроль	22,1	21
2.	OmpF 2 недели	19,2	24,8
3.	OmpF 4 недели	19,3	24,2
4.	OmpC контроль	6,3	37,5
5.	OmpC 2 недели	18,9	24,5
6.	OmpC 4 недели	5,8	37,7



**Рисунок 2.** Спектры КД в пептидной области YpOmpF (а) и YpOmpC (б) поринов после прогрева в течение 5 ч при 95 °С и рН 4,5 (синяя линия). Красная линия - контроль. На врезке: взаимодействие YpOmpF и YpOmpC поринов, с флуоресцентным зондом тиофлавином Т: спектры флуоресценции тиофлавина Т при связывании: с контрольными образцами белков (синяя линия), с белками после прогрева в течение 5 ч при 95 °С и рН 4,5 (красная линия)

Важную роль в исследовании пространственной структуры белка играет метод кругового дихроизма (КД). В частности, этот метод используют для определения изменений во вторичной структуре белка, происходящих под действием температуры, рН среды или различных денатурантов. Как видно из данных таблицы 1, инкубация поринов в мягких условиях (42 °С) не привела к значительному увеличению относительного содержания  $\beta$ -структуры в молекуле белков даже к концу срока наблюдения. Заметные конформационные перестройки были характерны только в случае YpOmpC белка: через две недели наблюдалось существенное увеличение  $\alpha$ -спиральных участков за счет уменьшения содержания структуры  $\beta$ -листа. В случае YpOmpF таких резких изменений в соотношении элементов регулярной вторичной структуры белка не наблюдалось. Предположительно, такой результат мог быть обусловлен конформацией исходного образца данного образца белка: он содержал более высокое содержание  $\alpha$ -спирали по сравнению с OmpC.

Нагревание исходных образцов поринов при 95 °С в кислой среде в течение 5 привело к различным эффектам. Как показали результаты взаимодействия продуктов инкубации поринов в этих условиях с тиофлавином Т, в случае YpOmpF максимум флуоресценции сместился в длинноволновую область, но при этом существенно, в 9 раз, падала интенсивность излучения (рис. 2). В случае YpOmpC наблюдалась незначительное увеличение интенсивности излучения, но не происходило смещения максимума спектра (рис. 2). Оба эти изменения, согласно литературным данным, могут служить свидетельством изменений в пространственной структуре белков, характерных для амилоидоподобных структур.

Действительно, как видно из данных рисунка 2 и таблицы 2 в молекуле OmpF наблюдается увеличение содержания  $\beta$ -структуры почти в 2 раза и резкое уменьшение количества  $\alpha$ -спиральных участков, в 3,5 раза. Что же касается OmpC, нагревание этого образца белка в кислых условиях при 95 °С привело к противоположным результатам (табл. 2, рис. 2). Наблюдалось уменьшение содержания  $\beta$ -структуры и увеличение более, чем в 2 раза, количества  $\alpha$ -спирали. Следует заметить, что при всех условиях инкубации изменения на уровне вторичной структуры белков наблюдались только для элементов регулярной вторичной структуры, содержание  $\beta$ -изгибов и неупорядоченной структуры (random coil) практически не изменялось.

Инфракрасная спектроскопия традиционно используется для обнаружения наличия в молекуле белка вторичной кросс- $\beta$ -структуры. С помощью ИК-спектроскопии показано, что молекулярная структура амилоидных фибрилл в целом отличается от  $\beta$ -слоев нативных белков [8]. Так, при исследовании белка литостатина (lithostathine, «белок панкреатических камней»), который собирается в неамилоидные фибриллы путем ассоциации субъединиц глобулярного белка [9]. Было установлено, что простая олигомеризация не приводит к существенным изменениям в области полосы амида I. Максимальное поглощение амилоидных фибрилл и нативных белков, имеющих конформацию  $\beta$ -слоев, наблюдается в пределах двух характерных, хотя и частично перекрывающихся спектральных областей. Диапазон амилоидных фибрилл простирается от 1611  $\text{см}^{-1}$  до 1630  $\text{см}^{-1}$ , в то время как нативные белки, включающие  $\beta$ -листы, дают пики амида I, кластеризующиеся между 1630  $\text{см}^{-1}$  и 1643  $\text{см}^{-1}$ . Кроме того, существуют также различия в форме полосы амида I, заключающиеся в том, что нативные белки с  $\beta$ -складчатой структурой имеют более широкие максимумы. Агрегация приводит к превращению пика около 1630  $\text{см}^{-1}$  в более узкий пик, сдвинутый в сторону меньших волновых чисел,

**Таблица 2.** Содержание элементов регулярной вторичной структуры YpOmpC и YpOmpF поринов в фосфатно-цитратном буферном растворе (pH 4,5) после инкубации в течение 5 ч при 95 °C

№ п/п	Образец	$\alpha$ -спираль	$\beta$ -структура
1.	OmpF контроль	20,0	26,7
2.	OmpF 5 ч, при 95 °C	4,1	42,0
3.	OmpC контроль	6,3	37,5
4.	OmpC 5 ч, при 95 °C	15,6	30,9

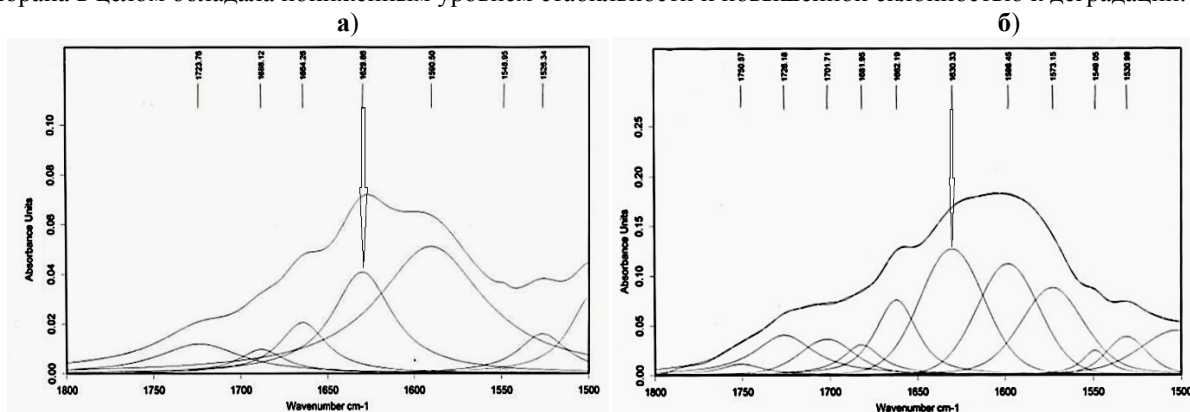
до 1627  $\text{см}^{-1}$  и увеличению абсорбции. Эти изменения указывают на увеличение числа  $\beta$ -тяжей, составляющих  $\beta$ -лист и/или образование более сильных (т.е. более коротких) Н-связей [10,11], что характерно для чрезвычайно стабильной структуры, такой как фибриллы.

Нами были получены ИК спектры двух образцов YpOmpF порина (исходного и после прогрева при 95 °C в течение 5 ч). Для съемки ИК-спектров образцы белков предварительно высушивали до постоянного веса при пониженном давлении (2Торр) при комнатной температуре (25 °C). ИК спектры исследуемых образцов поринов в КВг регистрировали на спектрофотометре с Фурье-преобразованием Vector 22 (Bruker, Германия). Анализ полученных спектров показал, что обработка белка в достаточно жестких условиях приводит к увеличению относительного содержания полосы при 1630  $\text{см}^{-1}$  (рис. 3), что свидетельствует о конформационных перестройках в молекуле порина, связанных с изменением количества и качества элементов  $\beta$ -структуры.

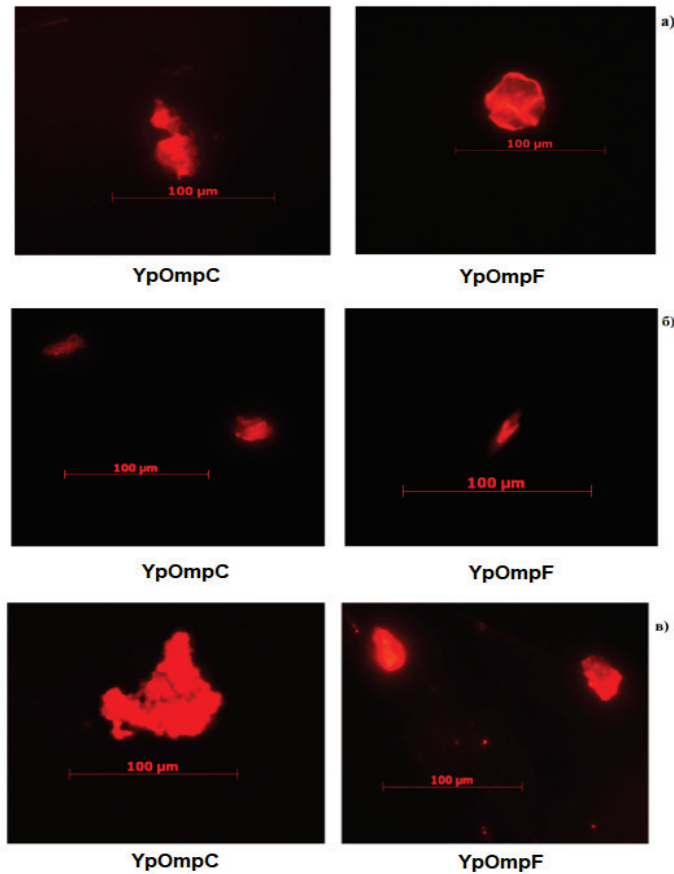
Известно, что состояния, которые временно возникают на пути сворачивания белков, относятся к кинетическим промежуточным продуктам. Из-за этой преходящей природы их сложно анализировать. Самыми ранними кинетическими промежуточными продуктами амилоидогенного пути являются олигомерные структуры, которые возникают как метастабильные состояния, способные преобразовываться в более термодинамически благоприятные конформации. При использовании тиофлавина Т амилоидные структуры хорошо визуализируются уже при малом увеличении микроскопа. С помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM510 META (Zeiss, Германия) нами были получены изображения белковых агрегатов, образующихся в процессе инкубации поринов при 42 и 95 °C в течение различных промежутков времени (рис. 4).

Как видно из данных рисунка 4, в исследуемых образцах поринов были обнаружены окрашиваемые тиофлавином Т структуры, однако, не совсем типичные для амилоидов. Они не имели общей формы и линейного вида, как у зрелых фибрилл или протофибрилл, не встречалась также морфология кольцевых агрегатов. Учитывая это, мы охарактеризовали полученные агрегаты как ранние промежуточные продукты амилоидогенного пути – олигомеры.

Одной из характеристик, общих для большинства амилоидных олигомеров, является способность разрушать мембраны, и это, как полагают, является причиной их токсичности. Более того, в недавних работах ряда исследователей было высказано предположение, что токсичность амилоидогенных белков связана не столько с нерастворимыми фибриллами, сколько с префибриллярными олигомерными интермедиатами, которые возникают на ранних стадиях формирования фибрилл [12-15]. С помощью техники бислойных липидных мембран (БЛМ) мы проанализировали способность олигомеров YpOmpF и YpOmpC поринов, полученных после инкубации при 42 и 95 °C, формировать функциональные каналы в модельной эукариотической мембране, которая состояла из смеси липидов (сфингомиелин/1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/холестерин) в молярном соотношении 1:1:1. Липиды растворяли в смеси n-гептан: хлороформ в объемном соотношении 9:1, концентрация смеси для формирования БЛМ составила 10 мг/мл. Полученная модельная мембрана в целом обладала пониженным уровнем стабильности и повышенной склонностью к деградации.



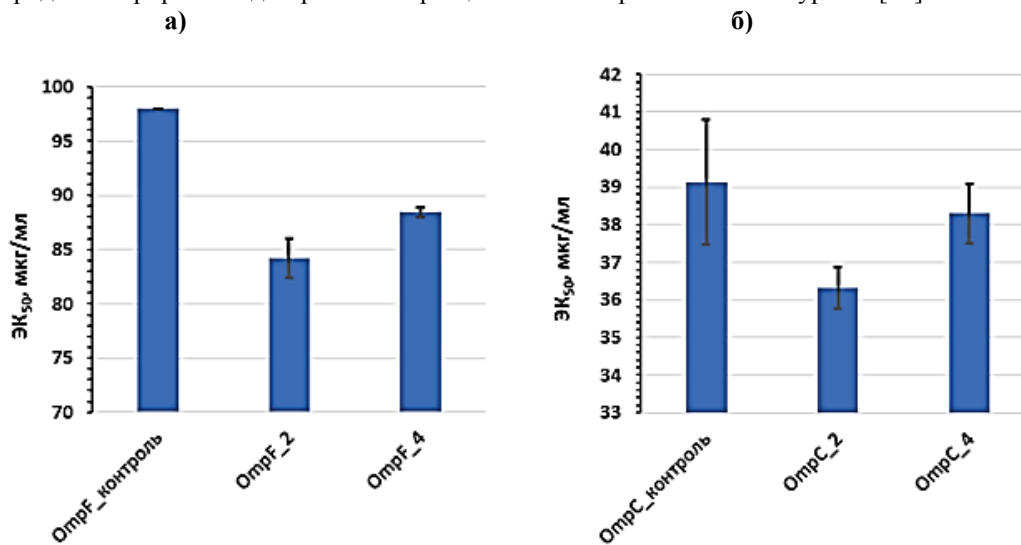
**Рисунок 3.** ИК-спектры (а) исходного YpOmpF порина и (б) после инкубации YpOmpF порина в течение 5 ч при 95 °C в фосфатно-цитратном буфере (pH 4,5)



**Рисунок 4.** Флуоресцентное изображение YpOmpC и YpOmpF поринов окрашенных тиофлавиномТ после инкубации в течение: (а) 2-х недель при 42 °С; (б) 4-х недель при 42 °С и(в) 5 ч при 95 °С в фосфатно-цитратном буфере (рН 4,5). Изображения были получены с помощью микроскопа AXIOImager. A1 (Zeiss) объектив ECPlan-NEOFLUAR 40x/0,75

Контрольные образцы поринов (исходные YpOmpF и YpOmpC белки) в концентрации 80 нг/мл при добавлении в ячейку проявили порообразующую активность, характерную в целом для поринов граммотрицательных бактерий. При реконструкции в БЛМ прогретых образцов поринов не было обнаружено ни порообразующей, ни мембранолитической активности.

Известно, что различные полиморфы олигомеров могут различаться по своей биологической активности, что было продемонстрировано для разных образцов олигомеров из белка HupF-N [16]. В настоящее время



**Рисунок 5.** Цитотоксичность YpOmpF/YpOmpC поринов по отношению к культуре клеток млекопитающих (нейробластома мыши Neuro-2aCCL-131™ (ATCC)). Цитотоксическую активность поринов выражали через эффективную концентрацию (ЭК<sub>50</sub>), при которой метаболическая активность клеток ингибируется на 50%. Долю мертвых клеток нормализовали в каждом случае относительно отрицательного контроля (ФСБ). Данные приведены как средние значения трех независимых экспериментов с учетом стандартного отклонения

накопилось достаточно данных о том, что амилоидные фибриллы, сформированные из белков или пептидов, являются цитотоксическими для различных видов клеток. Так, протофибриллы и зрелые фибриллы лизоцима человека вызывают лизис и агрегацию эритроцитов [17]. Было отмечено также, что способность фибрилл лизоцима индуцировать гемолиз и агрегацию интактных эритроцитов возрастает по мере «старения» фибриллы. Мы исследовали цитотоксическую активность YpOmpF и YpOmpC поринов по отношению к культуре клеток неробластомы мыши Neuro-2aCCL-131<sup>TM</sup> (рис. 5). Основанием для выбора этой клеточной линии в качестве модели, послужили имеющиеся в литературе сведения о том, что OmpF порин *E. coli*, в эксперименте *in vivo*, вызывает нейродегенерацию клеток коры головного мозга мышей, действуя как амилоид [5].

Клетки нейробластомы инкубировали с различными концентрациями поринов в течение 24 ч. Полученные данные свидетельствуют о том, что в случае YpOmpF порина прогрев белка в течение 2-х (YpOmpF\_2) и 4-х (YpOmpF\_4) недель при 42 °C и pH 4,5 увеличивает его цитотоксическую активность: значения ЭК<sub>50</sub> для образцов YpOmpF\_2 и YpOmpF\_4 были существенно меньше, по сравнению таковыми для исходного белка (рис. 5). Цитотоксическая активность исходного образца OmpC порина по сравнению с YpOmpF была более чем в 2,5 раза выше. Для этого типа неспецифических поринов псевдотуберкулезного микроба достоверное уменьшение цитотоксической активности было отмечено только для OmpC\_2. Таким образом, для обоих видов поринов наблюдалась общая тенденция изменения активности, что, возможно, свидетельствует о том, что через 2 недели инкубации в достаточно мягких условиях, неспецифические порины действительно формируют промежуточные олигомерные агрегаты, отличающиеся более высокой токсичностью по отношению к клеткам млекопитающих по сравнению с исходными образцами белков. Учитывая то, что прогретые YpOmpF и YpOmpC не проявляли функциональной активности в искусственной мембране, можно предположить, что реализация цитотоксической активности поринов в данном случае осуществляется по механизму, не связанному с нарушением целостности мембраны эукариотической клетки.

В результате проведенного исследования показано, что в процессе формирования амилоидоподобных агрегатов двумя близкородственными неспецифическими поринами (OmpF и OmpC) из НМУ *pseudotuberculosis* конформационные изменения в структуре этих белков происходят по-разному. Инкубация в кислой среде (pH 4,5) в мягких условиях при 42 °C в случае YpOmpC порина приводит к обратимому накоплению  $\alpha$ -спиральных участков в полипептидной цепи белка. В пространственной структуре YpOmpF порина существенных изменений в этих условиях не наблюдается, однако инкубация OmpF порина в кислой среде при 95 °C приводит к формированию олигомеров, которые отличаются повышенным содержанием и изменением качества структуры  $\beta$ -листа. В исследованных условиях агрегаты OmpC порина в повышенном содержании  $\beta$ -структуры не были обнаружены. По данным конфокальной микроскопии полученные агрегаты исследованных неспецифических поринов не содержали фибриллярных структур. Тем не менее, поскольку продукты инкубации как YpOmpF, так и YpOmpC поринов взаимодействовали со специфическим красителем тирофлавином Т и обладали более высокой токсичностью по отношению к клеткам нейробластомы мыши по сравнению с исходными образцами белков, их можно рассматривать как промежуточные агрегаты амилоидогенного пути – олигомеры.

#### Список литературы / References:

1. Uversky V. Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2013, vol. 1834, no. 5, pp. 932-951, doi: 10.1016/j.bbapap.2012.12.008.
2. Oates M.E., Romero P., Ishida T., Ghalwash M., Mizianty M.J., Xue B., Dosztanyi S., Uversky V.N., Obradovic Z., Kurgan L., Dunker A.K., Gough J. D2P2: Database of Disordered Protein Predictions. *Nucleic Acids Research*, 2013, vol. 41, no. D1, pp. D508-D516, doi: 10.1093/nar/gks1226.
3. Dass R., Mulder F.A.A. Nielsen J.T. ODiNPred: comprehensive prediction of protein order and disorder. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, p. 14780, doi: 10.1038/s41598-020-71716-1.
4. Novikova O.D., Uversky V.N., Zelepuga E.A. Non-specific porins of Gram-negative bacteria as proteins containing intrinsically disordered regions with amyloidogenic potential. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2021, vol. 183, no. 3, doi: 10.1016/bs.pmbts.2021.06.012.
5. Sahaya Rajan J.J., Chinnappan Santiago T., Singaravel R., Ignacimuthu S. Outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* induces neurodegeneration in mice by acting as an amyloid. *Biotechnol. Lett.*, 2016, vol. 38, doi: 10.1007/s10529-015-2025-8.
6. Kosolapova A.O., Belousov M.V., Sulatskaya A.I. et al. Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Biomolecules*, 2019, vol. 9, doi: 10.3390/biom9110694.
7. Nilsson M.R. Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. *Methods*, 2004, vol. 34, no. 1, pp. 154-160, doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.012.
8. Zandomenighi G., Krebs M.R.H., Mccammon M.G., Fändrich M. FTIR reveals structural differences between native  $\beta$ -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Science*, 2004, vol. 13, doi: 10.1110/ps.041024904.
9. Laurine E., Gregoire C., Fändrich M., Engemann S., Marchal S., Thion L., Mohr M., Monsarrat B., Michel B., Dobson C.M. Lithostathine quadruple-helical filaments form proteinase K-resistant deposits in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, doi: 10.1074/jbc.M306767200.
10. Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert J.-M. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. *In Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes; Springer: New York, NY, USA*, 1994, vol. 23, doi: 10.1007/978-1-4615-1863-1\_10.

11. Dobson C.M. Protein folding and misfolding. *Nature*, 2003, vol. 426, doi: 10.1038/nature02261.
12. Lashuel H.A., LaBrenz S.R., Woo L., Serpell L.C. Kelly J.W. Protofilaments, filaments, ribbons, and fibrils from peptidomimetic self-assembly: implications for amyloid fibril formation and materials science. *Am. Chem. Soc.*, 2000, vol. 122, doi: 10.1021/ja9937831.
13. Nilsberth C., Westlind-Danielsson A., Eckman C.B., Condron, M.M., Axelman K., Forsell C., Stenh C., Luthman J., Teplow D. B., Younkin S. G., Naslund J., Lannfelt L. The "Arctic" APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A $\beta$  protofibril formation. *Nat. Neurosci.*, 2001, vol. 4, doi: 10.1038/nn0901-887.
14. Bucciantini M., Giannoni E., Chiti F., Baroni F., Formigli L., Zurdo J., Taddei N., Ramponi G., Dobson C.M., Massimo S. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, 2002, vol. 416, doi: 10.1038/416507a.
15. Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., Selkoe D.J. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature*, 2002, vol. 416, doi: 10.1038/416535a.
16. Campioni S., Mannini B., Zampagni M., Pensalfini A., Parrini C., Evangelisti E. A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nat. Chem. Biol.*, 2010, vol. 6, doi: 10.1038/nchembio.283.
17. Patel P., Parmar K., Patel D., Kumar S., Trivedi M., Das M. Inhibition of amyloid fibril formation of lysozyme by ascorbic acid and a probable mechanism of action. *Int. Journal Biol. Macromol.*, 2018, vol. 114, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.152.

#### STUDY ON THE AMYLOIDOGENIC POTENTIAL OF NON-SPECIFIC *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* PORINS

Rybinskaya T.V., Portnyagina O.Yu., Zelepuga E.A., Khomenko V.A., Kim N.Yu., Chingizova E.A.,  
Menchinskaya E.S., Glazunov V.P., Chistyulin D.K., Novikova O.D.

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences  
100-let Vladivostoku ave. 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: tati2099.k@gmail.com

Received 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0514

**Abstract.** The paper considers the process of formation and properties of amyloid-like aggregates of outer membrane non-specific porins (OmpC and OmpF) of the gram-negative bacterium *Yersinia pseudotuberculosis* in an acidic medium (pH 4.5) at elevated temperature. The dynamics of the formation of amyloid-like aggregates of porins was monitored after two and four weeks of incubation (at 42 °C) and after 3-5 hours (at 90 °C) by staining the samples with amyloid-specific dye thioflavin T, analyzing the spectra of circular dichroism in the far UV region, IR -spectroscopy and confocal microscopy. It was found that in the case of porin OmpC, incubation under mild conditions (42°C) leads to a reversible accumulation of  $\alpha$ -helical regions in the protein polypeptide chain. No significant changes are observed in the spatial structure of OmpF porin under these conditions, however, under harsh conditions (95 °C) amyloid-like aggregates are formed, which are characterized by an increased content of the  $\beta$ -sheet structure. Using IR spectroscopy, it was shown that the conformational rearrangement in the molecule of OmpF porin is associated with a change in the quantity and quality of elements of the  $\beta$ -structure. According to confocal microscopy, the aggregates of the studied non-specific porins can be considered as intermediate products of the amyloidogenic pathway - oligomers. According to the literature data, these oligomers, which precede the formation of mature fibrils, have membranolytic and cytotoxic properties. For heated samples of the studied porins during reconstitution into bilayer lipid membranes, neither pore-forming nor membranolytic activity was detected. With respect to Neuro-2a CCL-131<sup>TM</sup> mouse neuroblastoma cells, the aggregates of OmpF and OmpC porins obtained after incubation had a higher toxicity compared to the initial protein samples.

**Key words:** porins of gram-negative bacteria, oligomers, amyloid fibrils, interaction with thioflavin T, cytotoxic activity.